



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Gert Linnas

**TEMPERATUURI MÕJU LAKKVAABIKU (*GANODERMA
LUCIDUM*) TÜVEDE KASVULE**

**EFFECT OF TEMPERATURE ON GROWTH OF *GANODERMA
LUCIDUM* STRAINS**

Bakalaureusetöö
Loodusturismi õppekava

Juhendaja: peaspetsialist Maidu Silm, MSc
Kaasjuhendaja: professor Rein Drenkhan, PhD

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Gert Linnas		Õppekava: Loodusturism	
Pealkiri: Temperatuuri mõju lakkvaabiku (<i>Ganoderma lucidum</i>) tüvede kasvule			
Lehekülgi: 31	Jooniseid: 11	Tabeleid: 1	Lisasid: 1
Osakond: Elurikkuse ja loodusturismi õppetool			
Uurimisvaldkond: B230, mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia			
Juhendaja(d): Maidu Silm, MSc ja Rein Drenkhan, PhD			
Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu 2021			
<p>Lakkvaabik (<i>Ganoderma lucidum</i>) on üheaastane saprotroofne seen ehk surnud orgaanilise aine lagundaja. Lakkvaabiku erinevaid tüvesid kultiveeritakse üle maailma, kuid Eesti seenetüvesid pole teadaolevalt kasvatatud ega uuritud.</p> <p>Töö eesmärgiks on uurida erinevate temperatuuride mõju lakkvaabiku erinevate tüvede kasvukiirusele puhaskultuuris. Hüpoteesiks on, et Eesti tüved kasvavad jahedamatel temperatuuridel kiiremini, kui võõramaised tüved.</p> <p>Töös kasutati kuute erinevat Eesti seenetüve (L1-L6), Mycelia Belgia päritolu tüve (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide tüve (L9). Iga seenetüve kohta tehti 9 katsetassi ning omakorda oli iga tüvi 3 korduses kolmel erineval temperatuuril: toatemperatuur (22°C), 30°C ja 9°C. Katse kestvus oli 3 nädalat laboritingimustes.</p>			

Kõige kiiremat seene mütseeli kasvu puhaskultuuris mõõdeti kõikide tüvede lõikes toatemperatuuril 2,53 mm ööpäevas ning kõige aeglasemat 9°C temperatuuril 0,18 mm ööpäevas. Kõige kiiremini kõikidel temperatuuridel kasvas seenetüvi L7 (Mycelia Belgia päritolu), mille keskmiseks kasvukiiruseks kolme temperatuuri alusel saadi 2,7 mm ööpäevas. Kõige aeglasemalt kasvas Eesti tüvi L1, mille kõikide temperatuuride keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti vaid 0,5 mm ööpäevas.

Lakkvaabiku Eesti tüvesid pole teadaolevalt varem testitud ega ka kasvatatud, antud katse tulemused annavad esialgse hinnangu seenetüvede erinevuse välja selgitamiseks ning nendega edasi töötamiseks.

Märksõnad: *Ganoderma lucidum*, kasvukiirus puhaskultuuris, seenekasvatus

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor´s Thesis	
Author: Gert Linnas		Specialty: Nature Based Tourism	
Title: Effect of temperature on growth of <i>ganoderma lucidum</i> strains			
Pages: 31	Figures: 11	Tables: 1	Appendixes: 1
Department: Chair of Biodiversity and Nature Tourism Field of research: B230, microbiology, bacteriology, virology, mycology Supervisors: Maidu Silm, MSc and Rein Drenkhan, PhD Place and date: Tartu 2021			
<p><i>Ganoderma lucidum</i> is saprotrophic fungus and decomposer of dead organic matter. Various strains of <i>Ganoderma lucidum</i> are cultivated all over the world, but Estonian origin fungal strains are not studied and grown.</p> <p>The aim of this thesis is to study the effect of different temperatures on the growth rate of different <i>Ganoderma lucidum</i> strains on pure medium. The hypothesis is that Estonian strains grow faster on cooler temperatures than foreign strains.</p> <p>Six different Estonian fungal strains (L1-L6), Mycelia strain of Belgian origin (L7), Hungarian strain (L8) and United States strain (L9) were used in the study. Nine petri dishes were made for each fungal strain and each strain was done in 3 replicates at three different temperatures: room temperature (22°C), 30°C and 9°C. The experiment lasted 3 weeks.</p>			

The fastest growth of the mycelium in pure medium was seen for all fungal strains at room temperature, 2.53 mm per day and the slowest 0.18 mm per day at 9°C. The fastest fungal strain growth at all three temperatures was the L7 (Mycelia, of Belgian origin), which average growth rate was 2.7 mm per day. The Estonian strain L1 had lowest growth, with an average growth rate was only 0.5 mm per day at all temperatures.

It is known that the Estonian strains of *Ganoderma lucidum* have not been tested or grown. The results of this experiment gives information of the difference between the fungal strains growth and work with these strains will be continue.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, growth speed on pure media, mushroom cultivation

SISUKORD

SISSEJUHATUS	7
1. LAKKVAABIKU (<i>Ganoderma lucidum</i>) TEOREETILINE ÜLEVAADE	8
1.1. Nimetus ja üldine kirjeldus.....	8
1.2. Lakkvaabiku looduslik leviala.....	9
1.3. Ajalugu, kasutamine rahvameditsiinis.....	9
1.4. Tähtsamad bioaktiivsed komponendid	10
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	11
2.1. Seente kultuurid ja materjalid.....	11
2.2. Seenetüvede kasvu analüüs	12
2.4. Mõõtmise ja andmetöötlus	13
3. TULEMUSED	14
3.1. Lakkvaabiku kasv toatemperatuuril.....	14
3.2. Lakkvaabiku kasv 30°C temperatuuril	16
3.3. Lakkvaabiku kasv 9°C temperatuuril	18
3.4. Lakkvaabiku tüvede kasvikiirused erinevatel temperatuuridel	21
4. ARUTELU	24
KOKKUVÕTE	27
KASUTATUD KIRJANDUS	28

SISSEJUHATUS

Arvatakse, et seeni on maailmas umbes 2.2 kuni 3.8 miljonit liiki (Hawksworth et al., 2017), nendest ainult umbes 148 000 on teaduse poolt kirjeldatud (Cheek et al., 2020). Läbi aastatuhandete on seeni kasutatud nii söögiks, kui ka rahvameditsiinis. Tänapäeval leiavad seened ka kasutust meditsiinis erinevate toidulisandite ja ravimite valmistamisel. Tänu seentele avastati ka kõige esimene antibiootikum, penitsilliin, mille avastas Šoti teadlane Alexander Fleming 1928. aastal *Penicillium rubens* ekstraktist (Lalchhandama, 2020). Tänapäeval leitakse seentele järjest rohkem uusi kasutusvaldkondi. Uueks suunaks on näiteks seente kasutamine mütseeli baasil segumaterjaliks ehk loodussõbraliku ja taastuva ehitusmaterjalina, mis võiks tulevikus vähendada suure ökoloogilise jalajäljega ehitusmaterjali kasutamist nagu näiteks betoon (Attias et al., 2020). Lisaks toodetakse seente mütseeli baasil ka nahasarnast materjali (Wojciechowska, 2017), mida nähakse alternatiivina sünteetilise naha kasutamisele. Seente ja seene mütseeli baasil loodud materjalide kasutusvaldkond on alles välja arenemas ja uusi materjale ning ühendeid lisandub aasta aastalt, kuna erinevad ettevõtted ja teadlased alles sisenevad sellesse valdkonda.

Selle töö eesmärgiks on analüüsida temperatuuri mõju lakkvaabiku erinevate tüvede kasvukiirusele puhaskultuuris. Töö hüpoteesiks on, et Eesti seenetüved suudavad jahedamal temperatuuril kasvada kiiremini, võrreldes lõunapoolsemate välismaiste seenetüvedega. Töö tulemusena valitakse välja kiirema kasvuga Eesti seene tüved, mida saab rakendada järgnevate projektide raames.

Antud töös on kasutatud APA viitamissüsteemi.

1. LAKKVAABIKU (*Ganoderma lucidum*) TEOREETILINE ÜLEVAADE

1.1. Nimetus ja üldine kirjeldus

Lucidum tähendab ladina keeles säravat või hiilgavat, mis viitab lakkvaabiku viljakeha välimusele, mis on pealt silmapaistvalt läikiv, justkui oleks see modelleeritud või lakitud (Wasser, 2005). Lakkvaabik (*Ganoderma lucidum*) kuulub taksonoomiliselt kandseente hõimkonda, on üheaastane, läikivpunane ja sitke viljalihaga torikseen. Viljakeha laius võib varieeruda 10-30 sentimeetri ulatuses, kujult on lakkvaabik lamelehvikjas ja enamjaolt on tal ka ebatsentriline jalg. Viljakeha värv võib varieeruda kollakaspunasest kuni punakaspruunini (Korhonen, 2007). Torukeste kiht on käsnyas ja pulberjas, valget või beežikat tooni. Lakkvaabiku eosed on ovaalsed, 6-11 µm suurused (Siwulski et al., 2015). Aasia sisemaal tuntakse seda seent Ling Zhi nime all, mis tähendab surematuse ja ravimtaime seent. Alates Yuani dünastiast (13. sajandist) on kujutatud lakkvaabikut kõiksuguses kunstis ja kujunduses. Kõige varasem Ling Zhi nime mainimine oli esimene Hiina keisri, Shinghuangi, ajal (Wasser, 2005). Lakkvaabik on enamasti saprotroof ehk surnud puidu lagundaja, kuid võib vahel harva esineda parasiidina. Lakkvaabik põhjustab puidu valgemädanikku. (Siwulski et al., 2015) Seene iseäralikku välimust on hästi näha joonisel 1.



Joonis 1. Lakkvaabiku viljakeha kõdupuidul. (Pildi autor: Aarne Suu)

1.2. Lakkvaabiku looduslik leviala

Lakkvaabik kasvab väga erinevatel surnud ja lagunevatel puudel. Eelistab lehtpuid nagu näiteks tamm (*Quercus*), vaher (*Acer*), lepp (*Alnus*), saar (*Fraxinus*), kask (*Betula*) ja pärn (*Tilia*). Lakkvaabikut esineb põhiliselt Euroopas ja Aasias, kuid ka Lõuna- ja Põhja-Ameerikas. Parasvöötme kliimas võib esineda ka surnud okaspuudel nagu näiteks kuusk (*Picea*) ja lehis (*Larix*) (Wasser, 2005). Eestis põhiliselt kase ja kuuse kõduneval ja surnud puidul (Korhonen, 2007).

1.3. Ajalugu, kasutamine rahvameditsiinis

Lakkvaabikut kasutatakse Aasia rahvameditsiinis hepatopaatia, kroonilise hepatiidi, neerupõletiku, kõrgvererõhutõve, liigesepõletiku jne. raviks (Chang et al., 1999; Siwulski et al., 2015). Hiinas on lakkvaabikust peetud lugu juba üle 4000 aasta, kui pika eluiga soosivast tõmmisest (Chang et al., 1999). Erinevad uskumused seoses lakkvaabiku raviomadustega põhinevad suuresti ebamäärastel tõenditel, traditsioonidel ja rahvakultuurist pärit normidel, kuid siiski hiljutised teadustööde tulemused pakuvad teaduslikke aluseid lakkvaabiku raviomadustele (Benzie et al., 2011). Hiina Rahvavabariigi Ravimiameti väitel taastab lakkvaabik inimese *chi*'d, rahustab meelt, leevendab köha ja astmat ning seda on soovitatud ka pearingluse, unetuse, südamepekslemise ja õhupuuduse puhul (Chinese Pharmacopoeia Commission, 2005).

Looduslikult kasvav lakkvaabik on haruldane, seetõttu enne selle kultuurseenena kasvatamist sai seda endale lubada ainult ühiskonna kõrgeim kiht. Usuti, et see püha seen kasvab ainult surematute kajas (McMeekin, 2004). Lakkvaabikut on hakatud aktiivselt kultiveerima alles viimase 40-50 aasta jooksul ja kõige populaarsemaks viisiks on selle kasvatamine saepuru ja/või põhuga täidetud kottides või puupakkudel (Boh et al., 2007).

Eestis lakkvaabik looduskaitse all ei ole, kuid on Eestis haruldane. Lakkvaabik on vana metsa tunnusliik (Anderssoni et al., 2016).

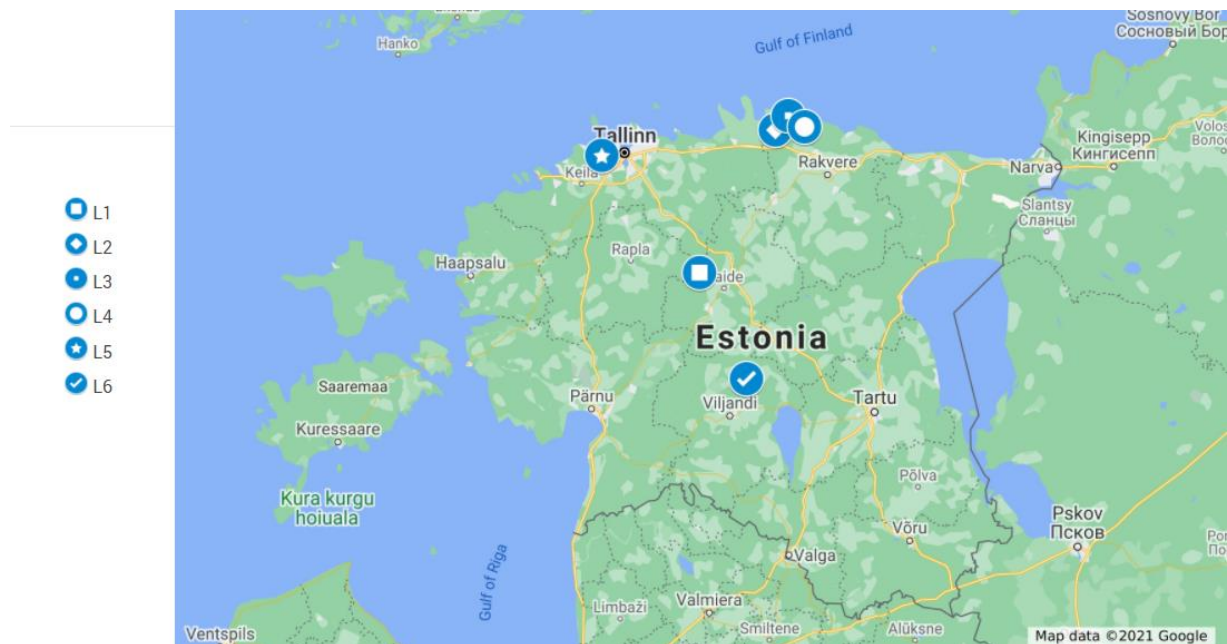
1.4. Tähtsamad bioaktiivsed komponendid

Enamik seeni koosnevad kaalult enamasti veest umbes 90%. Ülejäänud 10% jaguneb: 10-40% valk, 2-8% rasv, 3-28% süsivesikud, 3-32% kiudaine, 8-10% tuhk ning mõned vitamiinid ja mineraalained nagu näiteks kaalium, kaltsium, fosfor, magneesium, seleen, raud, tsink ja vask (Borchers et al., 1999). Ühes lakkvaabiku mittelenduvaid ühendeid analüüsivas uuringus leiti, et lakkvaabikud sisaldavad 59% toorkiudu, 26-28% süsivesikuid, 7-8% toorproteeini, 3-5% toorrasva ja 1.8% tuhka (Mau et al., 2001). Lisaks sisaldavad seened veel palju erinevaid bioaktiivseid ühendeid, nagu näiteks terpenoide, steroide, fenoole, nukleotiide, glükoproteiine ja polüsahhariide. Seenevalgud sisaldavad kõiki asendamatu aminosähteid ja eriti palju on neis lüsiini ja leutsiini (Borchers et al., 1999; Chang et al., 1996).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Seente kultuurid ja materjalid

Kuus Eesti päritolu seene tüve (L1-L6) puhaskultuuri, mida antud töös analüüsiti saadi juhendajalt Maidu Silm, kes isoleeris 2020. aasta kasvuhooajal seene eostest puhaskultuurid. L1 ja L2 tüved kasvasid kase (*Betula*) ning L4 männi (*Pinus*) puidul, ülejäänud tüvedel peremeesliiki määrata ei olnud võimalik, kasvusubstraat oli üsna kõdunenud. L1-L4 koguti juunis-juulis ning L5 ja L6 septembris ja oktoobris. Lisaks saadi Maidu Silmalt ka üks tüvi (L7)(*Mycelia Belgia* päritolu), üks Ungari tüvi korjatud Sopronist Ungaris (L8) ja üks Ameerika Ühendriikide päritolu *Ganoderma resinaceum* tüvi (L9). Eesti seene tüved (L1-L6) määrati molekulaarselt Eesti Maaülikooli metsapatoloogia töörühma poolt, täpne määrang kinnitas liiki *Ganoderma lucidum*. Eesti seene tüvede umbkaudsed kasvukohad on välja toodud joonisel 2.



Joonis 2. Eesti lakkvaabiku tüvede umbkaudsed kasvukohad kaardil (Aluskaart: Google 2021).

Seenetüvede kasvatamiseks valiti söötmeks PDA (potato dextrose agar), sest võrreldavates katsetes on PDA söötmel olnud lakkvaabiku kasv kõige kiirem (Bajwa et al., 2005; Fletcher et al., 2019) ning puhaskultuuride ettekasvatusel nähti kiireimat kasvu PDA söötmel. Soome seenetüvedega läbi viidud uuringus leiti, et MDA (malt dextrose agar) on Soome seenetüvedel parem, kui PDA (Cortina-Escribano et al., 2020). Sööde oli 3,75 protsendiline ja valmistati järgnevalt: 1 L destilleeritud vett ja 39g dehüdreeritud söötme pulbrit (MP Biomedicals). Valmis söötmelahuses oli 4g kartuliekstrakti, 20g glükoosi ja 15g agarit 1 liitri vee kohta. Peale korralikult läbisegamist keedeti söötmelahust 20 minutit, seejärel autoklaaviti söötmelahust 121°C temperatuuril 15 minutit ning seejärel valati laminaarkapis petri tassidele. Seejärel sööde jahtus 24h laminaarkapis.

Enne katse alustamist tehti kõikidest seene tüvedest uued külvid, et katse jaoks võetav materjal oleks ühesuguse vanuse ja arenguga, puhtad ning ilma saasteta. Uued ümberkülvid kasvasid ca ühe nädala enne katse jaoks ümberkülvide tegemist.

2.2. Seenetüvede kasvu analüüs

Seenetüvede kasvukiiruse hindamiseks kasutati eelnevalt ettevalmistatud PDA söötmega petri tasse ja seene puhaskultuure. Seene puhaskultuurist võeti ca 4x4 mm suurused mütseeli ruudud ning asetati laminaarkapis uutele söötmega petri tassidele ja seejärel suleti need saastumise vältimiseks Parafilmiga (Amcor, Ameerika Ühendriigid). Peale igat ümberkülvi ja katse tegemist steriliseeriti töövahendid. Iga seenetüve kohta tehti 9 katsetassi ning omakorda oli iga tüvi 3 korduses kolmel erineval temperatuuril.

Seenetüved katsetati järgnevatel temperatuuridel: 9 ($\pm 0,3$)°C, toatemperatuur 22($\pm 0,5$)°C ja 30 ($\pm 0,3$)°C. 9°C valiti, kuna tegu on Eesti kevadise ja sügisese kasvuperioodi keskmise temperatuuriga ehk oluline meie tingimustes seene kasvamiseks. Toatemperatuur, sest see on kõige tavapärasem laboris testimise tingimus ning lisaks ei nõua toatemperatuur lisakütmist ega

jahutamist. 30°C valiti, kuna lõunapoolsemate tüvede jaoks peetakse sobivaimaks temperatuuride vahemikku 25°C ...35°C (Kapoor et al., 2014).

Seenetüved kasvasid pimedas ja inkubaatoris (Panasonic, Jaapan) temperatuuridel 9 ja 30°C. Seenetüvede kasvukiirust mõõdeti kahe päeva järel, kus joonistati veekindla markeriga mütseeli kasvupiir petri tassi alumisele küljele. Nende kultuuride puhul, mis ei olnud vahepeal kasvanud ei märgitud jooni tassile vaid tehti vastav märges kausta. Seenekultuure kasvatati 3 nädalat, kuna selleks ajaks olid mitmed kultuurid petri tassi täis kasvanud. Sellega oli katse lõppenud.

2.4. Mõõtmine ja andmetöötlus

Kolme nädala järel võeti petri tassid kappidest välja, pildistati ning teostati mütseeli kasvukiiruse mõõtmine inokulumi keskpunktist. Seene kasvukiirust mõõdeti petri tassil 4 suunast. Mõõtmised tehti 0,01 millimeetri täpsusega. Mõõtmiseks kasutati Coolant-Cal™ digitaalset nihikut (iGaging, Ameerika Ühendriigid), mis Bluetooth tehnoloogia abil edastas mõõdud Excelisse. Mõõdeti iga korduse seene mütseeli kasv erineva temperatuuri kohta eraldi, seejärel arvutati keskmine kasvukiirus. Saadud andmeid analüüsiti Excelis kasutades t-test ja Anova funktsioone. Joonisel 3 on näha märgitud kasvupiirid 4 suunas.

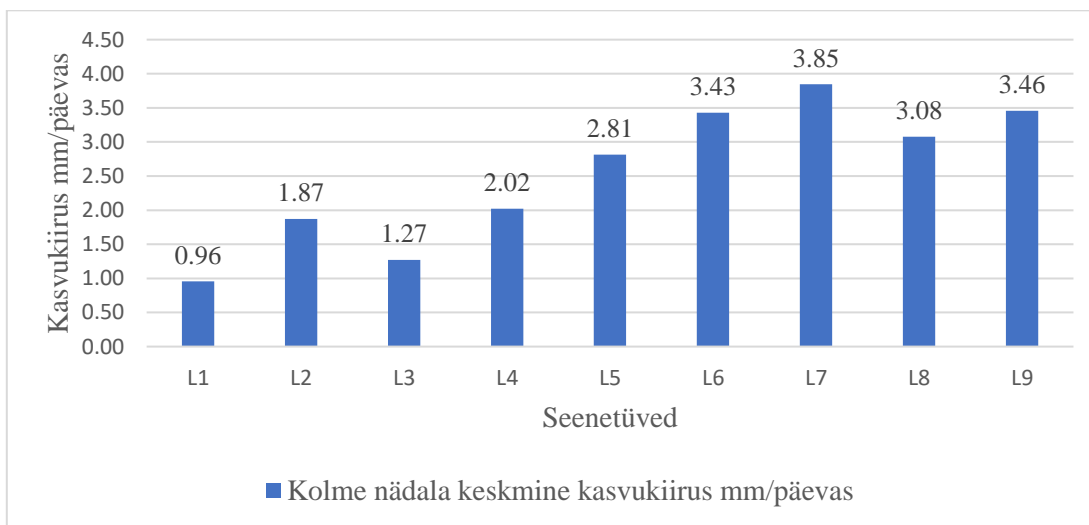


Joonis 3. Näide märgitud seene mütseeli kasvupiiridest petri tassil.

3. TULEMUSED

3.1. Lakkvaabiku kasv toatemperatuuril

Tulemused 22°C (toatemperatuuril) olid ootuspärased, sest kõik katsetatud seenetüved kasvasid. Kuid nagu võib näha jooniselt 4, siis keskmised kasvukiirused erinevatel Eesti tüvedel varieerusid oluliselt (vt joonis 4). Katsest tuli välja, et Eesti kiireima (L6) ja aeglaseima (L1) kasvuga tüvede keskmiste kasvukiiruste erinevus oli ca 2,5 mm/ööpäevas. Välismaiste tüvede kiireima (L7) ja aeglasema (L8) kasvuga tüvede keskmiste kasvukiiruste erinevus oli ca 0,8 mm/ööpäevas. Kiireima kasvukiiruse andis välismaine tüvi L7 (Mycelia Belgia päritolu) keskmiselt 3,85 mm/ööpäevas, mis oli ootuspärane, sest tegu on arvatavasti spetsiaalselt aretatud tüvega. Aeglaseima keskmise kasvuga oli Eesti tüvi L1 0,96 mm/ööpäevas. Head keskmist kasvukiirust näitasid Eesti tüved L5 - 2,81 mm/ööpäevas ja L6 - 3,43 mm/ööpäevas, mis kasvasid kõikide tüvede keskmisest kasvukiirusest (2,53 mm/ööpäevas) kiiremini.



Joonis 4. Kolme nädala keskmised lakkvaabiku kasvukiirused mm ööpäevas toatemperatuuril (22°C): Eesti (L1-L6), Belgia (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide (L9) päritolu tüvedel.

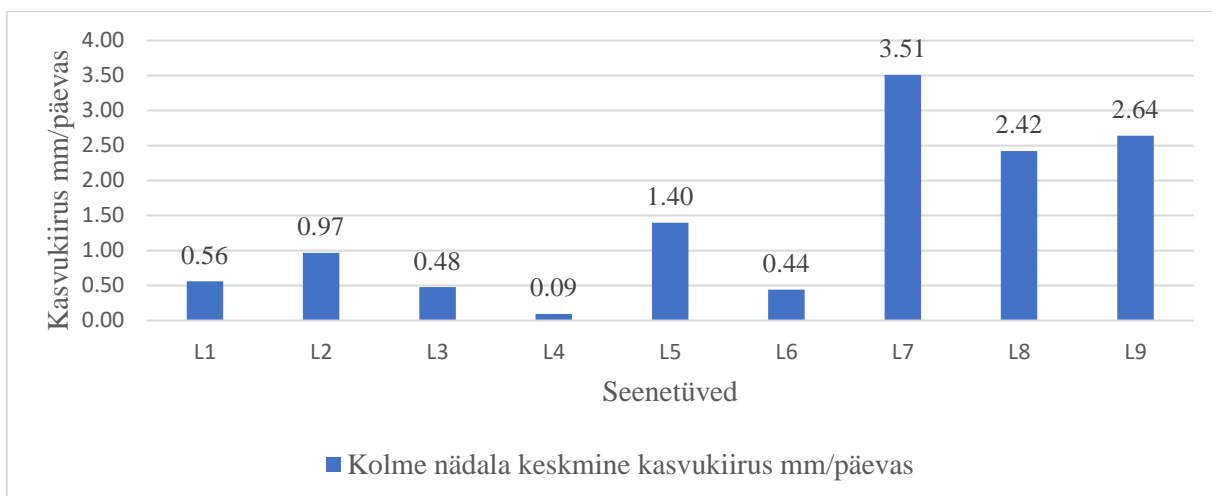
Mütseeli värvus ja välimus oli tüvede kaupa üsna varieeruv, samuti ei kasvanud mõned aeglasema kasvuga tüved korrapäraselt (vt joonis 5). Mida kiirem oli seene kasvukiirus söötmel, seda korrapärasem oli kasv. Lisaks täheldati välismaiste tüvedel (L7,L8,L9) kohevat ja valget mütseeli ning üldjuhul oli Eesti tüvedel (L1-L6) mütseel puhassöötmel visuaalselt tihedam ja pruunika varjundiga (joonis 5).



Joonis 5. Seenetüvede kasv toatemperatuuril (22°C) ning esimesed kiiremad tüved olid petri tassi täis kasvanud kolme nädalaga. Joonisel on järgmised seenetüved: Eesti tüved L1(1-3) - L6(1-3), Belgia tüvi L7(1-3), Ungari tüvi L8(1-3) ja Ameerika Ühendriikide tüvi L9(1-3).

3.2. Lakkvaabiku kasv 30°C temperatuuril

30°C temperatuuril ei vastanud tulemused ootustele, kõik tüved, kaasaarvatud välismaised (L7-L9) tüved kasvasid aeglasemalt kui toatemperatuuril (vt joonis 6). Kõige vähem avaldas 30 kraadine temperatuur mõju tüvele L7 (Mycelia Belgia päritolu). Eesti tüvedel oli keskmine kasv ca 2 korda aeglasem võrreldes toatemperatuuriga. Eesti tüvede (L1-L6) keskmiseks kasvukiiruseks 30°C temperatuuril oli ca 0,66 mm. Kõige kiiremini kasvas Eesti tüvedest L5 keskmise kasvukiirusega 1,4 mm/ööpäevas. Kõige aeglasemalt kasvas Eesti tüvi L4 keskmise kasvukiirusega 0,09 mm/ööpäevas. Välismaiste tüvede (L7-L9) keskmine kasvukiirus oli ca 2,86 mm ööpäevas. Kõige kiiremini kasvas välismaa tüvi L7 (Mycelia Belgia päritolu) keskmise kasvukiirusega 3,51 mm/ööpäevas (vt joonis 6). Keskmine kasvukiirus 30°C temperatuuril oli ca 1,39 mm/ööpäevas, sellest kiiremini kasvasid kõik välismaa tüved, s.o L7 (Mycelia Belgia päritolu) - 3,51 mm/ööpäevas, L8 (Ungari päritolu) - 2,42 mm/ööpäevas, L9 (Ameerika Ühendriikide päritolu) - 2,64 mm/ööpäevas ja Eesti tüvi L5 - 1,4 mm/ööpäevas.



Joonis 6. Kolme nädala keskmised lakkvaabiku kasvukiirused mm ööpäevas temperatuuril 30°C : Eesti (L1-L6), Belgia (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide (L9) päritolu tüvedel.

Lisaks leiti, et kõikidel tüvedel algas kultuuride kasv puhassöötmel 1-2 ööpäeva hiljem võrreldes toatemperatuuriga. Täheldati oluliselt suuremat värvuse erinevust Eesti ja välismaiste

seenetüvede vahel võrrelduna toatemperatuuriga (vt joonis 7, 8). Nagu eelnevalt toatemperatuuril, täheldati ka 30°C temperatuuril aeglasema kasvuga tüvedel (L1, L2, L3, L4, L6) ebasümmeetrilist kasvu.



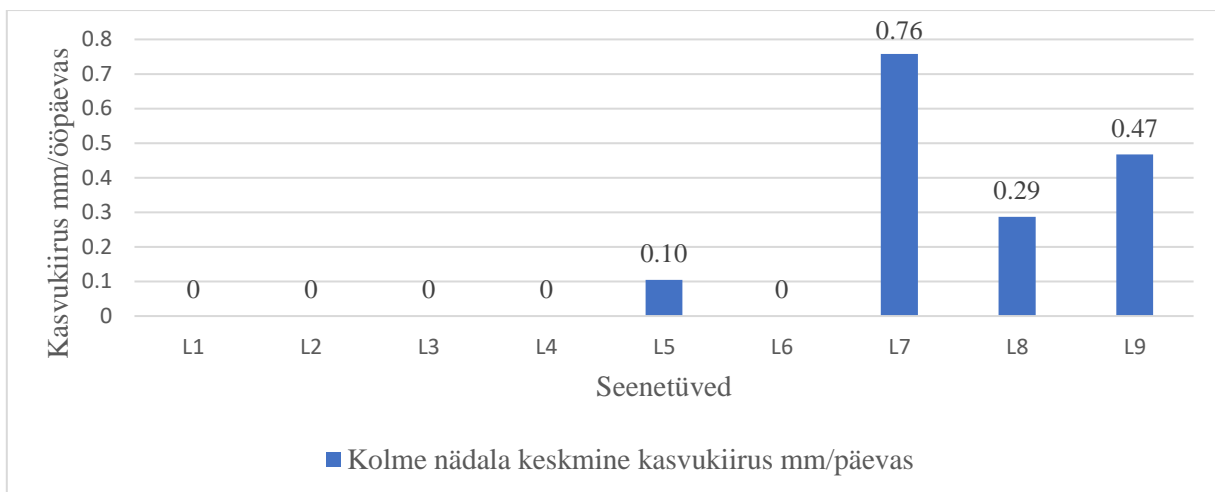
Joonis 7. Seenetüvede kasv temperatuuril 30°C ning esimesed kiiremad tüved olid petri tassi täis kasvatatud kolme nädalaga. Joonisel on näha järgmised tüved: Eesti tüved L1(1-3) - L6(1-3), Belgia tüvi L7(1-3), Ungari tüvi L8(1-3) ja Ameerika Ühendriikide tüvi L9(1-3).



Joonis 8. Pruunikas mütseel seenetüvel L3, kasvas 30°C temperatuuril.

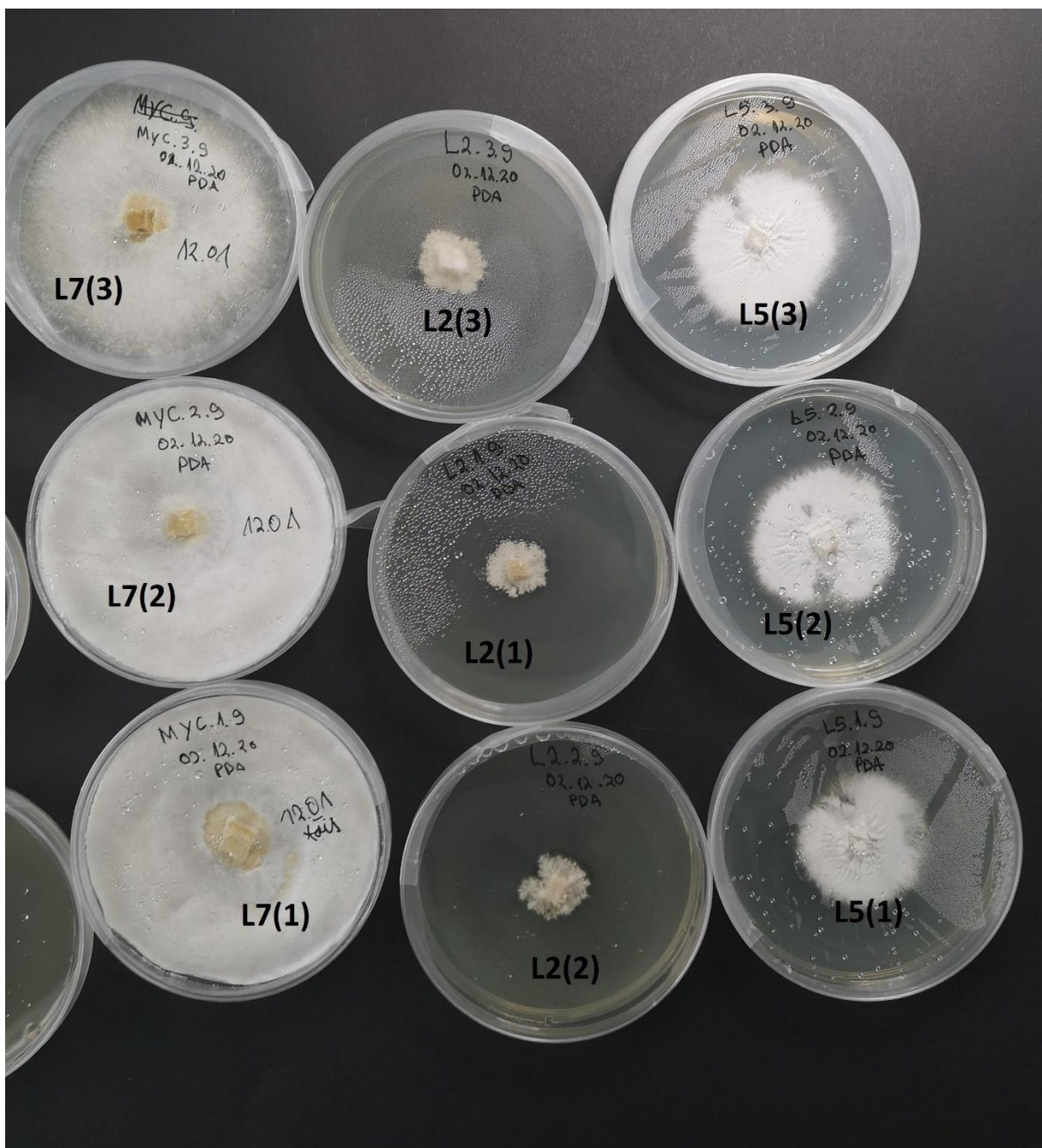
3.3. Lakkvaabiku kasv 9°C temperatuuril

Eesti tüvedest suutis 3 nädala jooksul kasvada ainult L5 keskmiselt 0,1 mm/ööpäevas (vt joonis 9). Teised Eesti tüved (L1-L4, L6) katse jooksul ei kasvanud. Kõik välismaised tüved (L7-L9) suutsid 9°C temperatuuril kasvu alustada. Kõige kiiremini kasvas 9°C temperatuuril seenetüvi L7 (Mycelia Belgia päritolu), mis kasvas keskmiselt 0,76 mm/ööpäevas. L7 oli 9°C temperatuuril ainus tüvi, mis kogu petri tassi täis kasvatas. L8 (Ungari päritolu) kasvas keskmiselt 0,29 mm/ööpäevas ning L9 (Ameerika Ühendriikide päritolu) kasvas keskmiselt 0,48 mm/ööpäevas. 9°C temperatuuril oli välismaiste (L7-L9) tüvede keskmiseks kasvukiiruseks ca 0,5 mm ööpäevas. Kõikide tüvede keskmiseks kasvukiiruseks 9°C temperatuuril oli ca 0,18 mm ööpäevas.



Joonis 9. Kolme nädala keskmised lakkvaabiku kasvukiirused mm ööpäevas temperatuuril 9°C: Eesti (L1-L6), Belgia (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide (L9) päritolu tüvede lõikes.

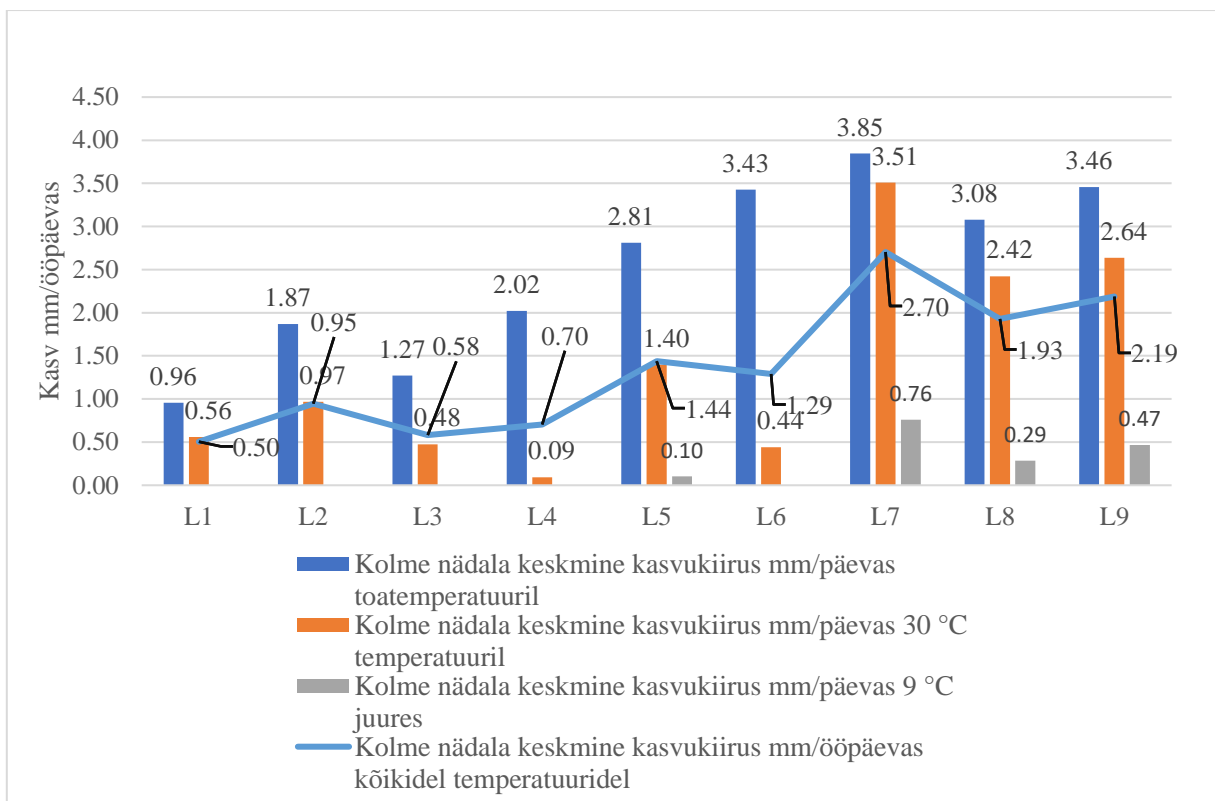
Nagu võib näha jooniselt 10, mis on tehtud ca 2 kuud peale külvi, siis ei suutnud L5 (Eesti tüvi) endiselt petri tassi täis kasvatada. Jahedamate temperatuuride puhul ei täheldatud pruunikat mütseeli kasvu, mis oli nähtav toatemperatuuri ja 30°C temperatuuril. Eesti tüved (L1-L6) kasvasid samuti valge mütseeli sarnaselt välismaiste tüvedega (L7-L9), kuid vähem koheva.



Joonis 10. Seenetüvede L7 (Belgia), L2 (Eesti) ja L5 (Eesti) mütseeli kasv 2 kuud peale külvi temperatuuril 9°C.

3.4. Lakkvaabiku tüvede kasvukiirus erinevatel temperatuuridel

Tulemused näitavad, et kasvukiirus kõikide tüvede ning erinevate temperatuuride vahel erines statistiliselt oluliselt ($p < 0,001$). Kõikide temperatuuride ja tüvede keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti 1,37 mm/ööpäevas (vt joonis 11) ning kasvu minimaalne ja maksimaalne vahemik on 0 mm ...3,85 mm. Kõikide seenetüvede keskmine kasvukiirus 30°C temperatuuril erines statistiliselt oluliselt kõikide seenetüvede keskmisest kasvukiirusest toatemperatuuril ($p = 0,023$, t-test) ja kõikide seenetüvede keskmisest kasvukiirusest 9°C temperatuuril ($p = 0,004$, t-test). Kõige kiiremini erinevatel temperatuuridel kasvas L7 (Mycelia Belgia päritolu) vastavalt toatemperatuuril keskmiselt 3,85 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 3,51 mm/ööpäevas ning 9°C temperatuuril keskmiselt 0,76 mm/ööpäevas. Seenetüve L7 keskmiseks kasvukiiruseks kolme temperatuuri järgi saadi 2,7 mm/ööpäevas (vt joonis 11). Seenetüvele L7 järgnesid kasvukiirusele ülejäänud välismaa tüved L9 (Ameerika Ühendriikide päritolu) ja L8 (Ungari päritolu). Seenetüvi L9 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 3,46 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 2,64 mm/ööpäevas ja 9°C temperatuuril keskmiselt 0,47 mm/ööpäevas. Seenetüvi L8 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 3,08 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 2,42 mm/ööpäevas ja 9°C temperatuuril keskmiselt 0,29 mm/ööpäevas. Kõige aeglasemalt kasvas Eesti tüvi L1, mille kõikide temperatuuride keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti vaid 0,5 mm ööpäevas. Tüvi L1 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 0,96 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 0,56 mm/ööpäevas ja temperatuuril 9°C seen katse jooksul ei kasvanudki. Väga aeglaselt kasvas veel Eesti tüvi L3, mille kõikide temperatuuride keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti 0,58 mm ööpäevas. Seenetüvi L3 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 1,27 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 0,48 mm/ööpäevas ja temperatuuril 9°C seen puhaskultuuris ei kasvanudki.



Joonis 11. Kolme nädala keskmised laakvaabiku kasvukiirused puhaskultuuris toatemperatuuril (22°C), 30°C ja 9°C temperatuuril Eesti (L1-L6), Belgia (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide (L9) päritolu tüvedel.

Eesti tüvedest (L1-L6) olid kiireima kasvuga L5 ja L6. Tüvi L5 keskmiseks kasvukiiruseks kõikidel temperatuuridel mõõdeti 1,44 mm ööpäevas. Tüvi L5 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 2,81 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 1,4 mm ja 9°C temperatuuril keskmiselt 0,1 mm/ööpäevas. Tüvi L6 keskmiseks kasvukiiruseks kõikide temperatuuridel mõõdeti 1,29 mm ööpäevas. L6 kasvas toatemperatuuril keskmiselt 3,43 mm ööpäevas, 30°C temperatuuril keskmiselt 0,44 mm/ööpäevas ja 9°C temperatuuril ei kasvanudki.

Kõikide tüvede võrdluses mõõdeti kõige kiiremad kasvukiirused toatemperatuuril ja kõige aeglasemad 9°C temperatuuril. Mõõdetud tulemused olid statistiliselt oluliselt erinevad ($p < 0,001$, t-test). Toatemperatuuril mõõdeti kõikide tüvede keskmiseks kasvukiiruseks 2,53 mm/ööpäevas, 30°C temperatuuril 1,39 mm/ööpäevas ning 9°C temperatuuril 0,18 mm/ööpäevas (vt tabel 1).

Tabel 1. Lakkvaabiku Eesti (L1-L6), Belgia (L7), Ungari (L8) ja Ameerika Ühendriikide (L9) päritolu tüvede keskmised kasvukiirused 22°C (toatemperatuuril), 30°C ja 9°C temperatuuril ja keskmine kasvukiirus kolme temperatuuri keskmisena

Seenetüvi	Kolme nädala keskmine kasvukiirus 22°C temperatuuril mm/päevas	Kolme nädala keskmine kasvukiirus 30°C temperatuuril mm/päevas	Kolme nädala keskmine kasvukiirus 9°C temperatuuril mm/päevas	Kolme nädala keskmine kasvukiirus kõikidel temperatuuridel mm/päevas
L1	0.96	0.56	0	0.50
L2	1.87	0.97	0	0.95
L3	1.27	0.48	0	0.58
L4	2.02	0.09	0	0.70
L5	2.81	1.40	0.10	1.44
L6	3.43	0.44	0	1.29
L7	3.85	3.51	0.76	2.70
L8	3.08	2.42	0.29	1.93
L9	3.46	2.64	0.47	2.19
Keskmine kasvukiirus	2.53	1.39	0.18	1.37

4. ARUTELU

Kõige kiiremat seene mütseeli kasvu puhaskultuuris mõõdeti kõikide tüvede lõikes toatemperatuuril 2,53 mm ööpäevas ning kõige aeglasem 9°C temperatuuril 0,18 mm ööpäevas. Toatemperatuuri ja 9°C temperatuuri kasvukiiruste erinevus oli statistiliselt oluline ($p < 0,001$; t-test). Kõige aeglasem kasv 9°C temperatuuril osutus ootuspäraseks. Kõige kiiremat kasvu näitas kõikide temperatuuride lõikes seenetüvel L7 (*Mycelia Belgia* päritolu), mille keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti kõikide temperatuuride lõikes 2,7 mm ööpäevas. Kõige aeglasemat kasvu näitas Eesti tüvel L1, mille keskmiseks kasvukiiruseks mõõdeti kõikide temperatuuride lõikes 0,5 mm ööpäevas. Keskmise kasvukiirus kõikide tüvede ning temperatuuride lõikes oli 1,37 mm ööpäevas. Parimateks Eesti tüvedeks osutusid L5 ja L6, mille keskmisteks kasvukiirusteks kõikide temperatuuride lõikes mõõdeti vastavalt 1,44 mm ja 1,29 mm ööpäevas. Leitud tulemuste põhjal on parim potentsiaal Eesti tüvedel L5 ja L6, mida saab tulevastes projektides edasi testida. Eesti kohalike tüvede testimine on oluline, sest kodumaised tüved on kohalike keskkonnatingimustega paremini kohastunud ning on osa olemasolevast ökosüsteemist. Kohalikku päritolu seened jäävad suurema tõenäosusega ellu ja suremus on väiksem. Kuid käesolevas töös seenetüvede ellujäämist välitingimustes ei analüüsitud. Uute seenetüvede sisse toomine välismaalt ja nende kultiveerimine võib ohustada kohalikke seeneliike ja seente mitmekesisust tervikuna.

Lakkvaabiku Eesti tüvesid pole teadaolevalt varem testitud ega ka kasvatatud, antud katse tulemused annavad infot seenetüvede erinevuse välja selgitamiseks ning nendega edasi töötamiseks. Seenpatogeene on mitmeid testitud laboritingimustes, et kasvukiiruse järgi hinnata nende agressiivsust ja ohtlikkust (nt Brasier & Webber 1987). Seega, mida kiirem kasv seda kiiremini suudab hõivata peremeestaime koed. Näiteks, jalakasurma tekitaja *Ophostoma novoulmi* alamliikide ja nende hübriidide kasvukiiruste võrdlusanalüüs toatemperatuuril puhaskultuuris näitab, et kõige kiirema kasvuga on seene hübriid ja seega ka ägedam patogeen (Jürisoo et al. 2021). Sarnaselt hinnatakse ka puitu asustavaid seeni, nt ohtliku patogeeni

juurepessu (*Heterobasidion annosum* s.l.) antagonisti hiidkooriku kasvukiirust kannus ja võimet tõrjuda konkurendist patogeenset seent (Oliva et al., 2015).

Seega kasvukiiruse analüüs laboris lakkvaabiku tüvedega võiks reeta need tüved, millised kasvavad substraadis konkurentidest kiiremini. Lakkvaabikuga katseid Eestis teadaolevalt läbi viidud ei ole, seega konkreetseid tulemusi võrrelda ei saa. Kuid 30°C temperatuuril erinesid tulemused eelnevatest katsetest märkimisväärselt, kus optimaalseks temperatuurivahemikuks enamike tüvede puhul oli leitud 25°C...35°C (Kapoor et al., 2014). Võib eeldada, et tegu oli soojalembeliste lakkvaabiku tüvedega. Ühes teises katses, milles kasutati samuti Mycelia Belgia päritolu seenetüve, leiti, et 30°C temperatuuril PDA söötmel Mycelia Belgia päritolu seenetüvi ei kasvanud (Fletcher et al., 2019). Eeldati, et Eesti tüved (L1-L6) võiks taluda jahedamat temperatuuri paremini ja kasvada seal kiiremini, kui lõunapoolsemad välismaised tüved. Kuid katse käigus leiti, et Eesti tüved (L1-L6) kasvasid 9°C oluliselt viletsamalt võrreldes välismaiste (L7-L9) tüvedega. Seega hüpotees, et Eesti tüved kasvavad jahedamatel temperatuuridel kiiremini, kui välismaised tüved, ei leidnud käesolevas analüüsis kinnitust. Katse käigus leiti, et optimaalseks temperatuuriks kõikidele tüvedele oli toatemperatuur (22°C). Edaspidi võiks sarnast katset korrata ka teistel temperatuuridel, nt 15°C ...25°C vahemikus olevate temperatuuridega, et selgitada välja optimaalseim seenetüvede kasvutemperatuur. Kindlasti tuleb parimate tüvede testimisel teha kasvukiiruse katsed puidus ja välitingimustes ning kas ja kuidas seenetüved viljuvad.

Kasvukiiruste oluline varieeruvus Eesti tüvede puhul toatemperatuuril võis olla tingitud seenetüvede geneetikast ja võimalik, et ka kasvusubstraadist millelt viljakehad leiti ehk millist substraati seen eelistab. Seost kasvusubstraadi ja kasvukiiruse vahel hinnata ei olnud võimalik, kuna kiiremakasvuliste Eesti tüvedel (L5 ja L6) ei olnud võimalik kasvusubstraati määrata. Kõige aeglasema kasvuga Eesti tüvel L1 (0,5 mm ööpäevas) ja keskmise kasvuga Eesti tüvel L2 (0,97 mm ööpäevas) oli kasvusubstraadiks kase puit.

Olulise aspektina täheldati visuaalselt antud katse tulemusena seda, et Eesti tüvedel oli palju tihedama kasvuga mütseel, mis võib viidata tõsiasjale, et mütseel on tugevam ja sitkem, kui välismaiste tüvede kohev mütseel. Antud töös ei olnud eesmärk analüüsida seene mütseeli omadusi, kuid mütseeli omadusi arvestades tuleviku plaane tasuks uurida. Seda eelkõige seetõttu, kui on kavas seene mütseeli baasil valmistada erinevaid materjale, kus materjali

tugevusel ja vastupidavusel on olulised omadused. Arvestades seene mütseeli esmast visuaalset hinnangut võib olla kiiremakasvuliste Eesti tüvede (L5 ja L6) puhul tegemist tüvedega, mille tugevuse ja kasvukiiruse suhe on optimaalsem, kui välismaiste (L7-L9) väga kiire kasvuliste tüvede mütseelil.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli hinnata, kuidas erinevad temperatuurid mõjutavad lakkvaabiku mütseeli kasvukiirust petri tassil puhaskultuuris. Katses võrreldi erinevaid Eesti ja välismaa tüvesid, et näha millised neist kasvavad erinevatel temperatuuridel paremini. Töö hüpoteesiks oli, et Eesti tüved on jahedamatel temperatuuridel edukamad, kui lõunapoolsemad tüved.

Katset viidi läbi igale seenetüvele erineval temperatuuri režiimil kolmes korduses. Mütseel puhaskultuuris kasvas pimedas kolm nädalat järgnevatel temperatuuridel: 9°C, 22°C ehk toatemperatuur ja 30°C. Kõikidel temperatuuridel oli vähemalt üks seenetüvi, mis suutis selle ajaga petri tassi täis kasvatada.

Käesoleva töö tulemusena selgus, et jahedaimal temperatuuril 9°C on Eesti tüvede kasv oluliselt aeglasem võrrelduna võõraste tüvedega, seega hüpotees ei leidnud kinnitust. Katse käigus selgus, et kõige kiiremini kasvasid kõik tüved toatemperatuuril, keskmise kasvukiirusega 2,53 mm ööpäevas ning kõige aeglasemalt 9°C temperatuuril, keskmise kasvukiirusega 0,18 mm ööpäevas. Kõige kiiremini kasvas erinevatel temperatuuridel seenetüvi L7 (Mycelia Belgia päritolu), keskmise kasvukiirusega 2,7 mm ööpäevas ning kõige aeglasemalt seenetüvi L1 (Eesti päritolu), keskmise kasvukiirusega 0,5 mm ööpäevas. Eesti seenetüvedest kasvas kõige kiiremini erinevatel temperatuuridel L5, keskmise kasvukiirusega 1,44 mm ööpäevas. Lisaks leiti visuaalse hinnangu tulemusel, et Eesti seenetüvede mütseel puhaskultuuris on tihedam ja sitkem, kui võõrastel seenetüvedel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Anderssoni, L., Eki, T., Külviku, M., Martverki, R., & Palo, A. (2016). *Metsa vääriselupaikade inventeerimise meetoodika*. Tallinn. Retrieved from https://www.envir.ee/sites/default/files/metsa_vaariselupaikade_inventeerimise_meetoodika_21092017.pdf
- Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., & Grobman, Y. J. (2020). Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: Comparative review and experimental analysis. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119037. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.119037
- Bajwa, R., Kausar, T., Nadeem, M., & Nasreen, Z. (2005). Study of different growth parameters in *ganoderma lucidum*. *Micología Aplicada Internacional*, 17.
- Benzie, I. F. F., & Wachtel-Galor, S. (Eds.). (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects* (2nd ed). Boca Raton: CRC Press.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Zhi-Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 13, pp. 265–301). Elsevier. doi: 10.1016/S1387-2656(07)13010-6
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1999). Mushrooms, Tumors, and Immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221(4), 281–293. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-86.x
- Brasier, C. M., & Webber, J. F. (1987). Positive correlations between in vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology*, 36(4), 462–466. doi: 10.1111/j.1365-3059.1987.tb02263.x
- Chang, S. T., & Buswell, J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12(5), 473–476. doi: 10.1007/BF00419460
- Chang, S.-T., & Buswell, J. A. (1999). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae)-A Mushrooming Medicinal Mushroom. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(2), 139–146. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i2.30
- Cheek, M., Nic Lughadha, E., Kirk, P., Lindon, H., Carretero, J., Looney, B., Douglas, B., Haelewaters, D., Gaya, E., Llewellyn, T., Ainsworth, A. M., Gafforov, Y., Hyde, K., Crous, P., Hughes, M., Walker, B. E., Campostrini Forzza, R., Wong, K. M., & Niskanen, T. (2020). New scientific

- discoveries: Plants and fungi. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(5), 371–388. doi: <https://doi.org/10.1002/ppp3.10148>
- Chinese Pharmacopoeia Commission (Ed.). (2005). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 1: ...* (Engl. version (2005)). Beijing: People's Medical Publ. House.
- Cortina-Escribano, M., Veteli, P., Riikka, L., Miina, J., & Vanhanen, H. (2020). Effect of wood residues on the growth of *Ganoderma lucidum*. *Karstenia*, 58(1), 16–28. doi: 10.29203/ka.2020.486
- Fletcher, I., Freer, A., Ahmed, A., & Fitzgerald, P. (2019). Effect of Temperature and Growth Media on Mycelium Growth of *Pleurotus Ostreatus* and *Ganoderma Lucidum* Strains. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*, 2(5), 6. doi: <https://doi.org/10.31031/CJMI.2019.02.000549>
- Google. (2021, May 25th). My Maps. <https://www.scribbr.com/proofreading-editing/>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. In *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology. Retrieved from <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819583.chap4>
- Jürisoo, L., Selikhovkin, A.V., Padari, A., Shevchenko, S.V., Shcherbakova, L.N., Popovichev, B.G., Drenkhan, R. (2021). The extensive damages of elms by Dutch elm disease agents and their hybrids in north-western Russia. Submitted.
- Kapoor, P., & Sharma, B. (2014). Studies on different growth parameters of *Ganoderma lucidum*. *Int J Sci Environ Tech*, 3, 1515–1524.
- Korhonen, M. (2007). *Tunne Seeni*. Tallinn: Kirjastus Varrak.
- Lalchhandama, K. (2020). Reappraising Fleming's snot and mould. *Science Vision*, 20(1), 29–42. doi: 10.33493/scivis.20.01.03
- Mau, J.-L., Lin, H.-C., & Chen, C.-C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34(6), 521–526. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00067-9
- McMeekin, D. (2004). The perception of *Ganoderma lucidum* in Chinese and Western culture. *Mycologist*, 18(4), 165–169. doi: 10.1017/S0269915X04004069
- Oliva, J., Zhao, A., Zarei, S., Sedláč, P., & Stenlid, J. (2015). Effect of temperature on the interaction between *Phlebiopsis gigantea* and the root-rot forest pathogen *Heterobasidion* spp. *Forest Ecology and Management*, 340, 22–30. doi: 10.1016/j.foreco.2014.12.021
- Siwulski, M., Sobieralski, K., Gola-Siwulska, I., Sokol, S., & Sękara, A. (2015). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. – health-promoting properties. A review. *Herba Polonica*, 61. doi: 10.1515/hepo-2015-0026
- Wasser, S. P. (2005). Reishi or ling zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 1, 603–622.

Wojciechowska, I. (2017). The Leather Underground: Biofabrication Offers New Sources for Fabrics. *AATCC Review*, 17(6), 18–23. doi: 10.14504/ar.17.6.1

**Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks
ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Gert Linnas,
(sünnipäev 28/aprill/1994 39404286026)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö Temperatuuri mõju lakkvaabiku (*Ganoderma lucidum*) tüvede kasvule, mille juhendajad on Maidu Silm, MSc ja Rein Drenkhan, PhD,
 - 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
 - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
 - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

Allkirjastatud digitaalselt.
allkiri

Tartu, 25.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)